

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局(43) 国际公布日:
2004年12月2日 (02.12.2004)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2004/103443 A1(51) 国际分类号⁷:

A61M 1/36, A61L 2/08

(21) 国际申请号:

PCT/CN2004/000516

(22) 国际申请日:

2004年5月21日 (21.05.2004)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

03136647.3 2003年5月22日 (22.05.2003) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 北京京精医疗设备有限公司(BEIJING JINGJING MEDICAL EQUIPMENT CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区万源街11号, Beijing 100176 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 吴卫星(WU, Weixing) [CN/CN]; 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN); 甘源(KAM, Yuen) [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区万源街11号, Beijing 100176 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市西城区宣武门西大街甲129号金隅大厦602室, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护):

AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PC, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护):

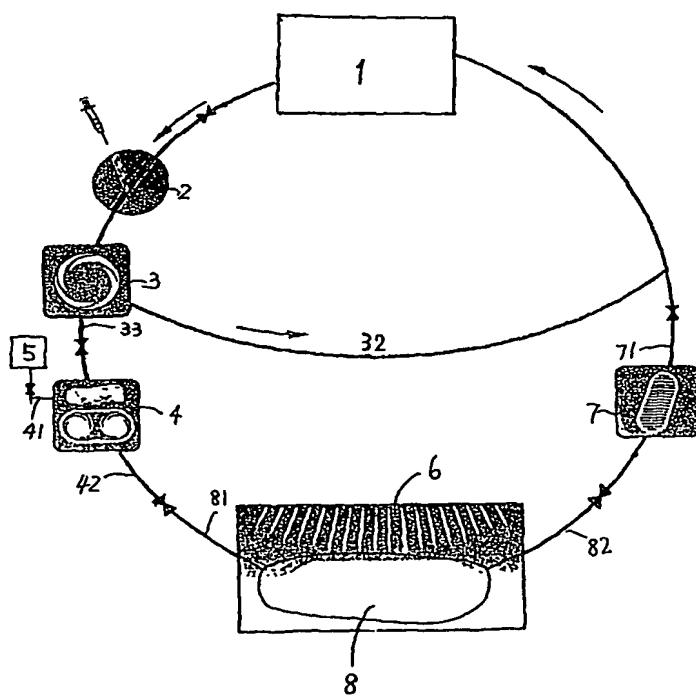
ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT 公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: METHOD FOR INACTIVATING VIRUS IN CIRCULAR BLOOD AND ITS APPLICATIONS IN TREATING VIRAL DISEASES

(54) 发明名称: 循环血液中病毒灭活方法及其在病毒性疾病治疗中的应用



(57) Abstract: The invention discloses a method for inactivating virus in circular blood, comprising the following steps: 1) adding anti-coagulants to a whole blood source, and founding a whole blood source circulation system; 2) withdrawing the anticoagulated whole blood to a blood separating device, pumping red blood cell back to the whole blood source directly after separating, and transfusing plasma to a mixture transport pump, 3) adding photosensitizer like methylene blue to the mixture transport pump at the same time, and after mixing the methylene blue and the plasma, pumping the mixture to a plasma container, 4) inactivating the mixture in the plasma container with light source, and pumping the inactivated mixture to a photosensitizer remover, 5) absorbing the methylene blue with the photosensitizer remover, and returning the inactivated plasma to the whole blood source, 6) repeating step 2 to 5 until the virus load of the whole blood source depress 99.99%. The invention can deal with blood in batches, pipelining and circulation with a sterile and isolated one-off closed system, and the inactivated plasma returning to the whole blood source can transfuse to organism directly. Further, the invention can be used in the treatment of Hepatitis-B virus, Hepatitis-A virus, AIDS virus and SARS virus etc, and the removal of the receptor virus in organ transplant.



(57) 摘要

本发明公开了一种循环血液中病毒灭活方法，包括下述步骤：

1) 全血源中加入抗凝剂，建立全血源循环系统；2) 将抗凝全血抽入血浆分离装置，分离后，红细胞直接泵回全血源，血浆进入混合输送泵；3) 同时向混合输送泵中加入光敏剂亚甲蓝，亚甲蓝与血浆混合后泵入血浆盛载器；4) 光照仪对血浆盛载器中混合的血浆进行光照灭活，灭活后血浆泵入光敏剂去除装置；5) 光敏剂去除装置吸附亚甲蓝，灭活后血浆抽回全血源；6) 重复步骤2) 至步骤5)，直至全血源中病毒含量降低 99.99%。本发明可以批量地、流水性以及循环处理血液，运用无菌和与外界隔离的一次性密闭系统进行处理，处理后的血浆回到全血源，可以直接用于输送到生物体。本发明还可进一步用于乙肝、丙肝、爱滋、SARS 等病毒疾病的治疗以及在器官移植中用于清除受体病毒。

循环血液中病毒灭活方法 及其在病毒性疾病治疗中的应用

技术领域

本发明涉及血液净化处理方法，具体涉及一种对循环血液中的病毒进行灭活的方法。

背景技术

众所周知，血液本身很容易沾染病毒，如乙肝病毒、丙肝病毒和艾滋病病毒等，而输血具有传播病毒性疾病的危险，血液安全是影响生命健康与安全的首要问题。对血液及其成分的病毒灭活是保障血液安全的措施之一，亚甲基蓝(MB)/光化学法可以灭活人血浆病毒，在对临床用单袋血浆的处理上已取得显著效果。但是，这种对单袋血浆的处理步骤比较繁琐：在处理之前需另外在特定环境中向血浆中添加亚甲蓝，再封袋，之后搁置在灭活装置中处理；而处理后的血浆，仍然无法直接使用，还必须再拆袋去除残留的亚甲蓝后再与红细胞混合才能用于输血。由于多次开袋和封袋，并且还有与红细胞混合的步骤，不仅对操作环境要求很高，既增加投入，也增加了袋内血液受污染的机会。如果需要长时间、大量地提供洁净的血液，单袋血浆分别处理的方法显然不能满足要求，需要创建一种可以对大量血液中病毒进行灭活的方法。

另一方面，目前对于病毒性疾病的治疗，一般均采用药物治疗，疗效慢；而对于慢性肝炎和艾滋病、SARS 等病症，目前尚无有效的治疗药物，急需创建一种从根本上能够消除引发病症的传染性病原体，从而有效根治这类病症的治疗方法。

发明内容

本发明的目的是提供一种对在循环血液中的病毒进行灭活的方法，它是对血液进行在线循环处理的方法，可以满足对循环血液进行实时在线病毒灭活。

为实现上述目的，本发明采取以下设计方案：

一种循环血液中病毒灭活方法，包括下述步骤：

- 1) 全血源中加入抗凝剂，建立全血源循环系统；
- 2) 将抗凝全血抽入血浆分离装置，分离后，红细胞直接泵回全血源，血浆进入混合输送泵；
- 3) 同时向混合输送泵中加入光敏剂亚甲蓝，亚甲蓝与血浆混合后泵入血浆盛载器；

4) 光照仪对血浆盛载器中混合的血浆进行光照灭活，灭活后血浆泵入光敏剂去除装置；

5) 光敏剂去除装置吸附亚甲蓝，灭活后血浆抽回全血源；

6) 重复步骤 2) 至步骤 5)，直至全血源中病毒含量降低 99.99%。

其中，供全血源为库血，来源于血站、血库、血袋或储血器，或者为体循环血液，来源于输血管道。

混合输送泵为蠕动泵，血浆输送速度为 30—150 毫升/分钟，光敏剂输入速度为血浆输送速度的 1%。

光照仪中光源为发光二极管组，血浆流入血浆盛载器内后接受光照仪光源的光照时间为 60 秒。血浆盛载器为两端带管道的密封容器。

光敏剂去除装置中所用吸附剂为凹凸棒材料。

上述泵管、管道、血浆分离器和血浆盛载器全部无菌并为与外界隔离的一次性密闭系统。

采用该方法，处理后的血浆为洁净血浆，可以直接送回全血源，用于输送到生物体；简化了血浆灭活的繁琐工序，可以批量地、流水性以及循环处理血液，实现实时在线对血浆进行病毒灭活；运用无菌和与外界隔离的一次性密闭系统进行处理，保证了血液的安全性。

本发明的另一目的，在于提供上述体外循环血液中病毒灭活方法在灭活体循环血液中病毒以及治疗病毒性疾病中的应用。

用于治疗的方案为：首先建立病人的体外循环，运用血液成分分离机将病人的血液分离为血浆和红细胞等其它成分，在血浆中加入一定数量的光敏剂，经光照仪照射后，去除光敏剂，将处理后的血浆与先前分离出来的红细胞等其他成分混合，重新输入病人体内。

本发明方法应用于血液净化处理，作为治疗性措施在动态的循环血中对体内的传染性病原体进行灭活，经过一定的循环次数后可有效降低病人体内的病毒数量，达到治疗作用。

附图说明

图 1 为本发明方法流程示意图；

图 2 为本发明方法中所用光照仪结构示意图；

图 3 为本发明方法中所用光敏剂去除装置结构示意图；

图 4 为本发明方法用于治疗病毒性疾病时流程示意图。

具体实施方式

如图 1 所示，示出本发明循环血液中病毒灭活方法流程，包括下述步骤：

- 1) 在全血源 1 中加入抗凝剂，建立全血源循环系统；
- 2) 将抗凝全血抽入血浆分离装置 3，分离后，红细胞经红细胞输送管 32 直接泵回全血源 1，血浆经血浆输送管 33 进入混合输送泵 4；
- 3) 同时经光敏剂输送管 41 向混合输送泵 4 中加入光敏剂亚甲蓝，调节加入速度和比例，使亚甲蓝与血浆在混合输送泵 4 的出液管 42 中混合。
- 4) 光照仪 6 对混合好的血浆进行光照灭活，灭活后血浆泵入光敏剂去除装置 7；
- 5) 光敏剂去除装置 7 吸附亚甲蓝，血浆经血浆输出管 71 抽回全血源 1 中；至此，完成全血源 1 中血浆分离、病毒灭活和去除光敏剂的一次循环过程，此时，经过此次循环可杀灭血浆中 99.99% 的病毒。重复步骤 2) 至步骤 5)，可对全血源进行多次循环处理，直至全血源中病毒含量水平不足以影响身体健康和血液功能。

在上述处理过程中，所用仪器设备及试剂、材料可以为：

- 1) 全血源：为库血，来源于血站、血库、血袋或储血器，或者为体循环血液，来源于输血管道。
- 2) 血浆分离装置：北京京精医疗设备有限公司生产的血浆分离机。
- 3) 混合输送泵：保定兰格恒流泵有限公司生产的 BT00-100M 型蠕动泵
- 4) 光照仪光源：采用方形发光二极管（波长为 600—700nm）。经加工制成功发光板，本发明中使用两块此发光板，对血浆上下两面同时照射。
- 5) 光照仪照度测定方法：采用照度计测定光照强度。测量点距离与处理样品距离一致。
- 6) 光照仪血浆盛载器：透明型血袋（100ml、200ml 规格，PVC 材料制成）。
- 7) 抗凝剂：CPDA 保养液，ACD 保养液，肝素。
- 8) 光敏剂亚甲基蓝（MB），北京永康制药厂生产的静脉注射用药品，规格 20mg/2ml。亚甲蓝的配制：在超净工作台中用 0.9% 的灭菌静注用生理盐水稀释 267.5 倍，配成 100μmol/L（含亚甲蓝 37.4μg/ml）为亚甲蓝储存液。灭活时再做 100 倍稀释，即光敏剂输入速度为血浆输送速度的 1%，终浓度为 1μmol/L。
- 9) 光敏剂吸附材料：凹凸棒（天然多孔的纳米材料），交联琼脂包嵌凹凸棒微囊(CAA)，CAA 的制备工艺：
 - (1) 凹凸棒的预处理：粉状凹凸棒原料药由南京大学制药厂提供，用前经稀酸浸泡约 2 小时，然后用碱中和，经蒸馏水反复处理至近中性，105℃下烘干后，仔细碾碎、过筛、除去 100 目以下微粉各用。

(2)微囊制备及交联反应：取适量琼脂粉(青岛水产品厂生产)混悬于蒸馏水中,干沸水浴中加热至琼脂熔化,溶液呈半透明无胶状物为止,制成2—6%浓度的琼脂溶液。再将凹凸棒粉按重量比20~30%混入热琼脂溶液中,仔细搅拌均匀。用加压喷珠法将上述混合物喷射至预先冷却的医用石蜡油混合物中,尽可能控制微囊大小,防止结块及凝结。聚集在底部的琼脂凹凸棒微囊待冷却后固化成“软珠”。先将“软珠”与大量石蜡油分离,然后用蒸馏水等洗除残留的石蜡油及琼脂残屑,每100ml琼脂可得CAA微囊200~250mL。

将软珠置于三口烧瓶内,加入计算量的交联剂环氧氯丙烷(使用前重蒸),稀NaOH溶液及适量稳定剂,混合均匀后,于40℃~50℃水浴中加热交联2~4h,不断振摇,以防止软珠凝结,直至交联反应完成。此时,可取少量CAA用蒸馏水洗净,调其pH值至近中性后,于小烧杯中煮沸10min,若蒸馏水清澈透明、微囊光洁不散、无琼脂脱落等现象,即说明交联反应已完成,能耐消毒灭菌处理。

上述包嵌完好的CAA微囊,冷却后滤出,经蒸馏水洗涤,稀酸中和,加入专门清除环氧交联剂的清洗液浸泡,取样分析无环氧氯丙烷残存后,按微囊直径大小,用分样筛分成<1mm、1~2mm、2~3mm、>3mm规格,分别装瓶,并用乙醇、蒸馏水最后清洗,以蒸馏水或生理盐水浸泡,密封供消毒灭菌用。

(3)灭菌：上述CAA密闭装瓶于121℃消毒30min,冷却后观察无琼脂脱落,上清液清澈透明,即得CAA成品,备用。

本发明中,最佳使用的光照仪6,可以采用图2所示结构:

光照仪6包括一个用于支撑血浆盛载器8的托板61,两块分置于托板61上下两面的作为光源的上发光板621和下发光板622,两块分别置于发光板外侧的上散热板631和下散热板632,以及风扇组64;托板61、发光板621和622、散热板631和632、以及风扇64均组装在光照仪机箱65中。光照仪机箱65两侧面具有穿孔651和652,血浆盛载器8置于所述托板61上,其进血管81通过光照仪6机箱65的穿孔651伸到光照仪机箱65之外,出血管82分别通过光照仪6机箱65的穿孔652伸到光照仪机箱65之外。

光照仪6中,发光板62的光源为发光二极管组,由很多发光二极管组装而成。发光二极管的数目和排列方式不限,以提供足够强度的光照为准。

托板61被安装在光照仪机箱65内,上面放置血浆盛载器8;为了使血浆盛载器8内的血浆和亚甲蓝可以进一步充分混合,在托板61的一端安装有步进电机66,当步进电机66工作时,带动托板61晃动或震动。

可用的血浆盛载器8可以为两端带管道的密封透明容器,也可为两端带软

管的血浆袋。为保证灭毒性能，其形状最好为扁平状。

光照仪 6 的前面，管道连接混合输送泵 4。泵 4 具有两个进口，一个用于连接血浆源输送管 33，一个用于连接光敏剂源 5 输送管 41；泵 4 的出液管 42 直接连通血浆盛载器 8 的进血管 81。泵 8 可以将血浆和光敏剂按设定速度和比例泵入并在出液管 42 中混合后输送至血浆盛载器 8。光敏剂可用亚甲蓝。

本发明中，最佳使用的光敏剂去除装置 7，可以采用图 3 所示结构：光敏剂去除装置 7 为亚甲蓝过滤吸附器，参见图 3；过滤吸附器 7 具有管状外壳，分为两端的管帽 71 和中间管 72 两部分，管帽 71 与中间管 72 螺接为可以连通的一体；其两端管帽 71 具有可与导管连接的突出连接端 73，导管直径为 2—5 毫米，中间管 72 直径为 2cm，两端由里向外依次设海绵层 74、无纺布层 75、带孔的挡板 76 和环形的密封垫圈 77。中间管 72 内填充有吸附材料 78，为天然多孔的纳米材料——凹凸棒；中间管 72 两端的多层结构允许液体渗过但可以隔离吸附材料 78 进入吸附过滤器 7 两端的导管 73；挡板 76 外侧的密封垫圈 77 可以防止中间管 72 内液体从与管帽 71 之间的间隙渗出。

本发明方法用于治疗时，请参见图 4：首先建立病人的体外循环，运用血液成分分离机将病人的血液分离为血浆和红细胞等其它成分，在血浆中加入一定数量的光敏剂，经光照仪照射后，去除光敏剂，将处理后的血浆与先前分离出来的红细胞等其他成分混合，重新输入病人体内。经过一段时间的循环后，可有效降低病人体内的病毒数量，达到治疗作用。

实施例一：

在室温下，向取自血袋中的全血源 2000 毫升中注入 200 毫升 ACD 保养液作为抗凝剂，将混合后的全血以 100 毫升/分钟速度抽入全血分离装置，分离后的红细胞泵回全血源，血浆以 100 毫升/分钟速度进入蠕动泵，同时，以 1 毫升/分钟速度将 0.1mmol/l 的亚甲蓝加入蠕动泵，从蠕动泵中流出混合后的血浆和亚甲蓝液并输入血浆盛载器中，混合液在光照仪中接受光照 60 秒灭活后，流入光敏剂去除装置，去除亚甲蓝后的纯净血浆再经管道流回全血源中；循环 120 分钟后关闭全血源输出管控制阀，待所有血液流回全血源，停止处理过程。

实施例二：

采用与实施例一相同的方法，改变全血源为 1000 毫升，抗凝剂为 300 单位的肝素，血液分离速度及血浆输入速度控制在 30 毫升/分钟，亚甲蓝加入速度为 0.3 毫升/分钟，循环时间控制在 60 分钟。

实施例三：

在室温下，向取自血袋中的全血源 3000 毫升中注入 900 单位的肝素作为

抗凝剂，将混合后的全血以 150 毫升/分钟速度抽入全血分离装置，分离后的红细胞流入红细胞存储袋，血浆以 150 毫升/分钟速度进入蠕动泵，同时，以 1.5 毫升/分钟速度将 0.1mmol/l 的亚甲蓝加入蠕动泵，从蠕动泵中流出混合后的血浆和亚甲蓝液并输入血浆盛载器中，混合液在光照仪中接受光照 60 秒灭活后，流入光敏剂去除装置，去除亚甲蓝后的纯净血浆再经管道流入中血浆存储袋； 20 分钟后关闭全血源输出管控制阀。红细胞存储袋中的红细胞和血浆存储袋中的血浆重新混合使用或分别使用。

对经上面处理后的全血取样，对全血源中的病毒数量和各项生化指标进行检测，对照灭活前的指标，对灭活效果和生物安全性进行评价。

1、病毒灭活效果检测

分别检测水泡性口炎病毒（VSV）和 Sindbis 病毒（SV）。分别用非洲绿猴肾（Vero）细胞和金黄地鼠肾(BHK₂₁)细胞以微量细胞病变法测病毒滴度，按 Karber 法计算 IgTCID₅₀ 来检测病毒灭活效果。参见表 1-1：

表 1-1 本发明处理前后血浆的病毒灭活效果

全血源体积 (ml)	循环时间 (分)	病毒残留滴度 IgTCID ₅₀	
		VSV	Sindbis
1000	60	≤ - 0.5	≤ - 0.5
2000	120	≤ - 0.5	≤ - 0.5
病毒对照		5.75	5.75

从表 1-1 可以看到，采用本发明方法对全血源处理一段时间后，即可灭活其中病毒。

2、本发明处理过程对血浆成分的影响测试

材料与方法：

凝血因子Ⅷ、IX 检测试剂盒：购自成都输血所，使用按说明书上的方法。

生化指标的测定：用进口全自动生化分析仪检测。

凝血因子检测：用进口自动血凝分析仪检测。

血浆 pH 的测定：用进口 pH 计测定。

灭活后血浆中亚甲蓝残留量的测定：按中国药典亚甲蓝项目下的吸光度检测方法，用进口紫外/可见分光光度计测定。

补体 C₃ 的测定：用邦定公司的琼脂单扩散板测定。

2.1 对凝血因子Ⅷ活性的影响测定：使用成都输血所生产的Ⅷ因子检测试剂盒，检测经 60 分钟循环处理的三批样品，每批二袋血浆。结果如表 2-1 所示，经循环处理 60 分钟可致血浆中凝血因子Ⅷ的活性略有降低，降低幅度在

20%以内。

表 2-1 循环处理 60 分钟对血浆凝血因子 VIII 活性的影响

样品批号	I	II	III
处理样品			
因子 VIII 活性 (%)	101(90.4%)	131.1(85.1%)	117.6(83.7%)
对照样品			
因子 VIII 活性 (%)	111.7(100%)	154.1(100%)	140.5(100%)

2.2 对凝血因子 IX 活性的影响：使用成都输血所生产的因子 IX 检测试剂盒，检测三批样品，每批二袋血浆。结果如表 2-2 所示，循环处理 60 分钟可致血浆中凝血因子 IX 的活性略有降低，降低幅度在 10% 左右。

表 2-2 循环处理 60 分钟对血浆凝血因子 IX 活性的影响

样品批号	I	II	III
处理样品			
因子 IX 活性 (%)	106.1(88.3%)	125.2(93.9%)	89.4(94.7%)
对照样品			
因子 IX 活性 (%)	120.2(100%)	133.2(100%)	94.4(100%)

2.3 用自动凝血仪对灭活前后血浆中多种凝血因子进行检测：
结果见表 2-3。

表 2-3 循环处理 60 分钟对血浆凝血因子活性的影响

凝血因子	对照血浆	处理血浆 (降低)
PT	14.9'' (100%)	19.6'' (31.5%)
APTT	63.0'' (100%)	74.0'' (17.5%)
II	24.6'' (100%)	25.0'' (1.6%)
V	29.2'' (100%)	31.8'' (8.9%)
VII	25.0'' (100%)	26.8'' (7.2%)
VIII	78.0'' (100%)	83.6'' (7.2%)
IX	63.6'' (100%)	66.7'' (4.9%)
X	29.6'' (100%)	32.6'' (10.1%)
XI	77.4'' (100%)	82.6'' (6.7%)
XII	67.7'' (100%)	70.2'' (3.7%)

2.4 对补体 C3 含量的影响：用邦定生物公司生产的单扩散板，按使用说明操作，扩散 48 小时，用游标卡尺测扩散环的直径，查含量表。结果如表 2-4 所示，经循环处理 60 分钟的全血源中血浆补体 C3 含量与对照相比有 5% 左右的降低。

表 2-4 循环处理 60 分钟对全血源中血浆补体 C3 含量的影响

样品批号	I	II	III
处理样品 (mg/ml)	5.64 (95.1%)	5.43 (93.7%)	5.61 (95.9%)
对照样品 (mg/ml)	5.93 (100%)	5.82 (100%)	5.85 (100%)

2.5 对血浆蛋白等生化成分的影响：用自动生化分析仪检测结果见表 2-5、2-6、2-7。

表 2-5 循环处理 60 分钟对全血源中血浆生化酶类活性的影响

指标名称	单位	对照血浆	处理血浆
谷草转氨酶	iu/l	19 (100%)	16 (84.2%)
乳酸脱氢酶	iu/l	109 (100%)	119 (109.2%)
肌酸激酶	iu/l	108 (100%)	55 (50.9%)
碱性磷酸酶	iu/l	55 (100%)	60 (109.1%)
谷氨酰转肽酶	iu/l	16 (100%)	17 (106.2%)
谷丙转氨酶	iu/l	15 (100%)	19 (126.6%)

表 2-6 循环处理 60 分钟对全血源中血浆蛋白含量的影响

指标名称	单位	对照血浆	处理血浆
葡萄糖	mM/l	22.6 (100%)	21.2 (93.8%)
总蛋白	g/l	58.8 (100%)	58.8 (100%)
白蛋白	g/l	36.8 (100%)	36.1 (98.1%)
甘油三酯	mM/l	1.54 (100%)	1.62 (105.2%)

表 2-7 循环处理 60 分钟对全血源中血浆无机盐含量的影响

指标名称	单位	对照血浆	处理血浆
Ca	mM/l	1.40 (100%)	1.57 (121.1%)
P	mM/l	1.18 (100%)	1.19 (100.8%)
Mg	mM/l	0.66 (100%)	0.67 (101.5%)
Na	mM/l	135.7 (100%)	135.1 (99.8%)
K	mM/l	3.24 (100%)	3.22 (99.3%)
Cl	mM/l	58.9 (100%)	58.7 (99.7%)
Cho	mM/l	3.86 (100%)	3.82 (98.9%)

2.6 对全血 pH 值的影响：将全血用生理盐水做 5 倍稀释用 Hanan pH 计检测处理前后的变化，结果表明（表 2—8）本发明处理方法不引起全血本身的 pH 值改变。

表 2—8 循环处理 60 分钟对全血 pH 值的影响

样品批号	I	II	III
处理样品	7.35	7.38	7.36
对照样品	7.34	7.38	7.36

2.7 电泳检测：将处理前后的全血经免疫电泳、交叉免疫电泳、凝胶电泳、SDS-凝胶电泳以及醋酸纤维素膜电泳检测未见新的抗原产生以及电泳区带和迁移率的变化。

以上实验表明，用本发明方法对全血进行循环处理 60 分钟后，在保证完全灭活血浆病毒的条件下，对血浆中各种生理活性成分未见明显的影响。

3、光敏剂去除装置对亚甲蓝吸附效果的实验

在本发明中，采用的是交联琼脂包嵌凹凸棒微囊(CAA)作为亚甲蓝的吸附材料。CAA 对血浆中不同浓度的亚甲蓝吸附作用实验：吸附器过滤直径 2 厘米，CAA 装载高度 7 厘米。在血浆中加不同量的亚甲蓝，使亚甲蓝的终浓度分别为 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20 $\mu\text{mol/l}$ ，分别测滤前与滤后的吸光度。测定结果参见表 3—1

表 3—1 CAA 对血浆中不同浓度 MB 的吸附

血浆中 MB 浓度 ($\mu\text{mol/l}$)	滤前 OD	滤后 OD	吸附率 (%)
1	0.063	0.001	98.4
2	0.114	0.003	97.4
3	0.173	0.009	94.8
4	0.227	0.020	91.2
6	0.340	0.027	92.1
8	0.447	0.038	91.5
10	0.560	0.044	92.2
15	0.805	0.054	93.3
20	1.043	0.069	93.4

对本发明循环处理 60 分钟后全血源中 CAA 进行测定，浓度为 0.002 $\mu\text{mol/l}$ ，说明经光敏剂去除装置后，血浆中加入的亚甲蓝已被吸附。

经上述实验可以验证，本发明方法处理后的血液为洁净血液，病毒灭活效果明显，而对血液其它生物指标影响较小；增加的光敏剂去除装置，可以吸附添加的光敏剂，最大降低光敏剂对生物体可能产生的副作用；本发明采用与外界隔离的一次性密闭系统进行全血处理，降低了对血液二次污染的发生，同时简化操作工序，可以批量地、流水性以及循环处理全血，实现实时在线对血液病毒的灭活，保证了血液的安全性。

模拟实验一：

为观察该灭活技术降低人体血液循环中病毒滴度的速度，进行了体外循环模拟试验。将含有指示病毒的 1500 ml 正常人血浆放入密闭的贮存池中，在蠕动泵的作用下使血浆形成循环通路。当血流速度为 50 毫升/分，循环灭活处理不同时间，检测血浆中的 VSV 和 Sindbis 病毒下降滴度，结果显示两病毒均下降了 5.0 Lg TCID₅₀ 以上（见表 4）。

表 4 血浆贮存池中病毒滴度下降的速度

照射时间 (h)	残余病毒滴度 (Lg TCID ₅₀)	
	VSV	Sindbis
1	2.63	2.88
2	- 0.13	0.37
4	≤ - 0.50	≤ - 0.50
对照	5.25	5.50

注：贮存池血浆总量为 1500 ml；血浆流速为 50 ml / min；用压三条折线的 15 厘米标准血袋照射处理

模拟实验二：

观察不同血袋形状和血浆流速对体外模拟循环中病毒灭活效果的影响：由于血浆流过标准 15 cm 血袋用时较短，难以达到较好的病毒灭活效果，实验中对标准血袋进行了改制。结果表明，用中间压五条折线的血袋处理 50 ml/min 的流动血浆，灭活病毒效果明显提高（表 5）。

模拟实验三：

照射路径长度对体外模拟循环中病毒灭活效果的影响：为延长光源对流动血浆的照射时间，提高病毒灭活效率，研究中以不同长度的 PVC 透光输血管替代血袋，观察了照射路径长度对病毒灭活效果的影响。当照射路径为 2 米，照射时间 26 秒，血浆流速为 50 ml/min 时，可灭活大于 5 LgTCID₅₀ 的 VSV 和 Sindbis 病毒（表 6）。

表 5 不同血袋形状和血浆流速对病毒灭活效果的影响

血袋形状	血浆流速 (ml/min)	残余病毒滴度 (VSV, Lg TCID ₅₀)
标准 15 厘米血浆直通袋	50	4.25
	80	5.13
		6.25 (对照)
标准 15 厘米血袋 (中间压三条折线)	50	- 0.25
	80	1.50
		5.25 (对照)
标准 15 厘米血袋 (中间压五条折线)	50	≤ - 0.50
	80	0.13
		4.63 (对照)

表 6 照射路径长度对病毒灭活效果的影响

照射路径长度 (m)	照射时间 (sec)	残余病毒滴度 (Lg TCID ₅₀)	
		VSV	Sindbis
4.0	52.0	≤ - 0.5	≤ - 0.5
3.5	45.5	≤ - 0.5	≤ - 0.5
3.0	39.0	≤ - 0.5	≤ - 0.5
2.5	32.5	≤ - 0.5	≤ - 0.5
2.0	26.0	≤ - 0.5	≤ - 0.5
对照		6.0	5.3

注：血浆流速为 50 ml/min.

权 利 要 求

- 1、一种循环血液中病毒灭活方法，其特征在于，包括下述步骤：
 - 1) 全血源中加入抗凝剂，建立全血源循环系统；
 - 2) 将抗凝全血抽入血浆分离装置，分离后，红细胞直接泵回全血源，血浆进入混合输送泵；
 - 3) 同时向混合输送泵中加入光敏剂亚甲蓝，亚甲蓝与血浆混合后泵入血浆盛载器；
 - 4) 光照仪对血浆盛载器中混合的血浆进行光照灭活，灭活后血浆泵入光敏剂去除装置；
 - 5) 光敏剂去除装置吸附亚甲蓝，灭活后血浆抽回全血源；
 - 6) 重复步骤 2) 至步骤 5)，直至全血源中病毒含量降低 99.99%。
- 2、根据权利要求 1 所述的体外循环血液中病毒灭活方法，其特征在于：所述全血源为库血，来源于血站、血库、血袋或储血器，或者为体循环血液，来源于输血管道。
- 3、根据权利要求 1 所述的体外循环血液中病毒灭活方法，其特征在于：所述的混合输送泵为蠕动泵，血浆输送速度为 30—150 毫升/分钟，光敏剂输入速度为血浆输送速度的 1%。
- 4、根据权利要求 1 所述的体外循环血液中病毒灭活方法，其特征在于：所述的光照仪中光源为发光二极管组，血浆流入血浆盛载器内后接受光照仪光源的光照时间为 60 秒。
- 5、根据权利要求 4 所述的体外循环血液中病毒灭活方法，其特征在于：血浆盛载器为两端带管道的密封容器，其置于光照仪中。
- 6、根据权利要求 1 所述的体外循环血液中病毒灭活方法，其特征在于：所述的光敏剂去除装置中所用吸附剂为凹凸棒材料。
- 7、根据权利要求 1 至 6 任一所述的体外循环血液中病毒灭活方法，其特征在于：所述步骤 1) 至步骤 5) 所用的泵、管道、血浆分离装置和血浆盛载器全部无菌并为与外界隔离的一次性密闭系统。
- 8、权利要求 1 至 7 任一所述体外循环血液中病毒灭活方法在灭活生物体循环血液中病毒的应用。
- 9、权利要求 1 至 7 任一所述体外循环血液中病毒灭活方法在病毒性疾病治疗中的应用，具体步骤为：建立病人的体外循环，对分离后的血浆中病毒进行灭活后与先前分离出来的红细胞等其他成分混合，重新输入病人体内，并循环操作。

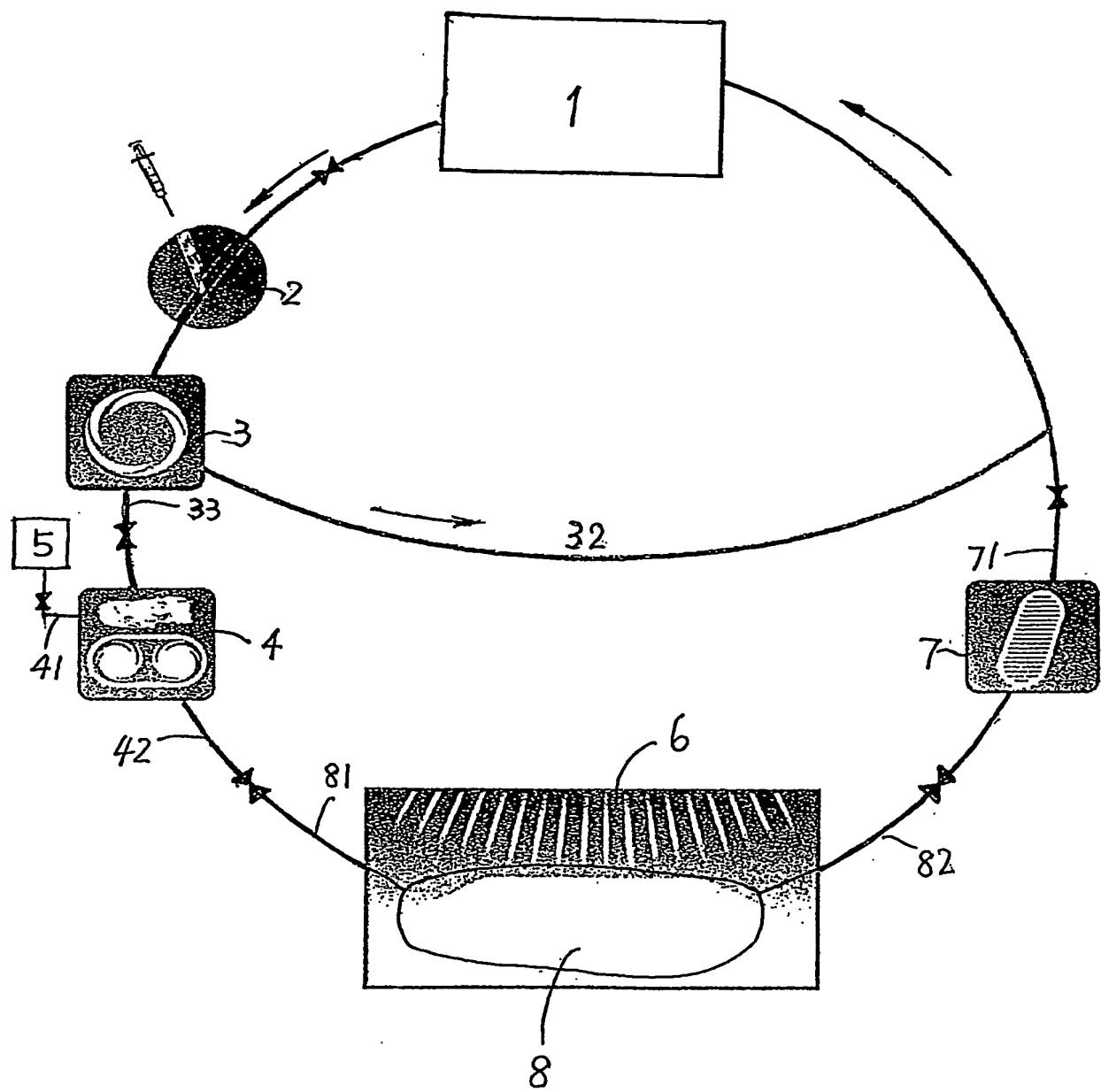


图 1

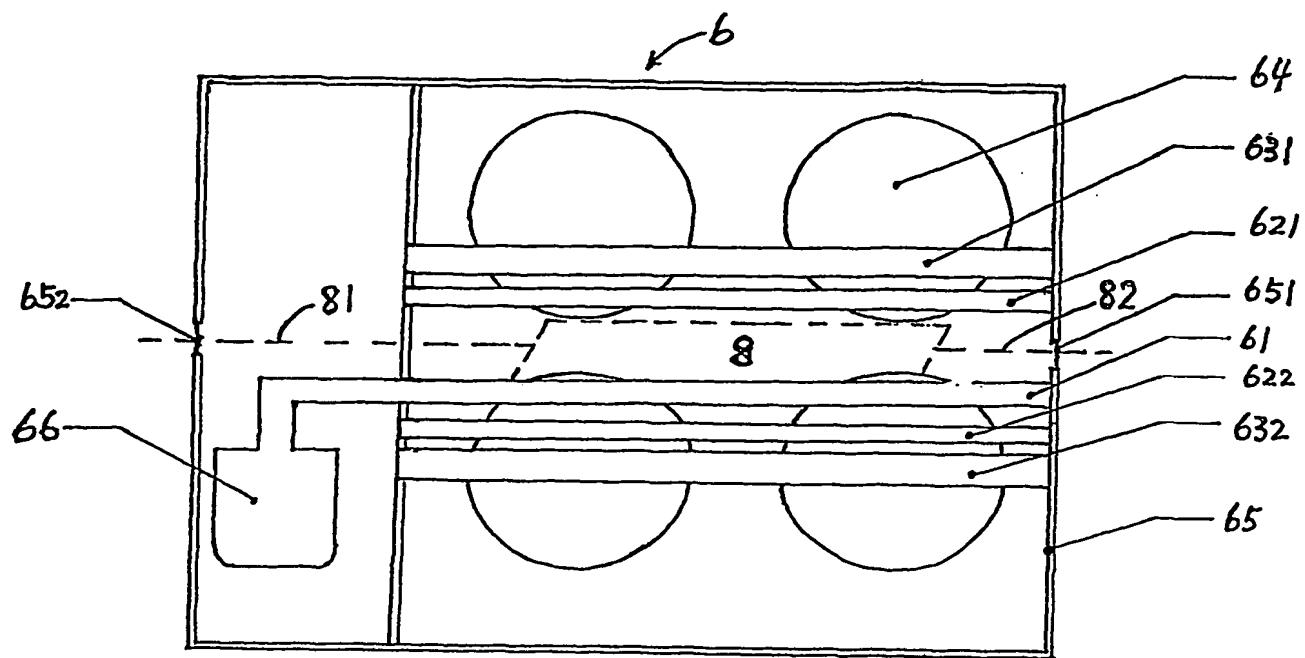


图 2

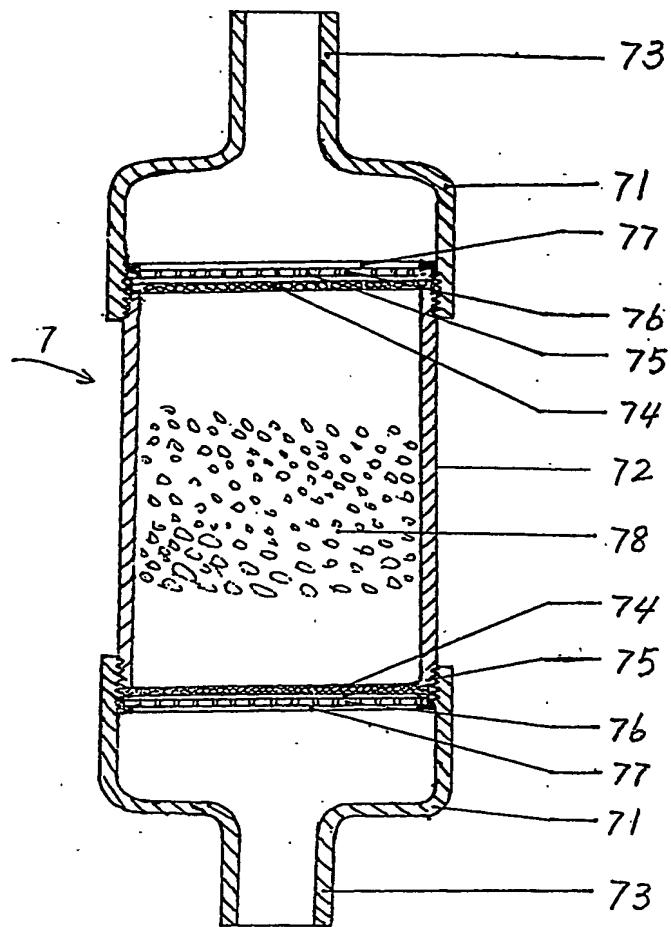
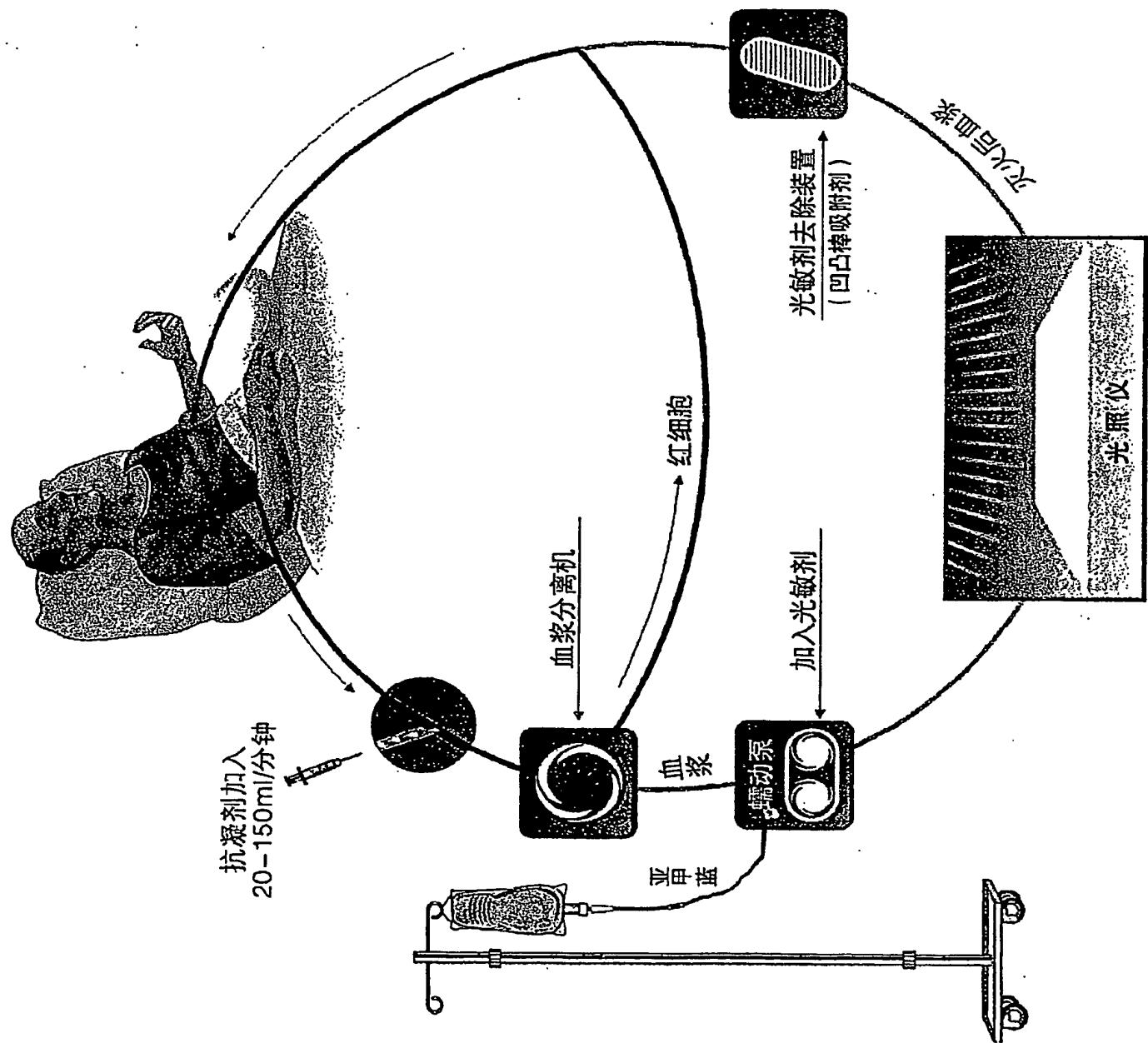


图 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: A61M 1/36 A61L2/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 : A61M 1 A61L2

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT,WPI,EPODOC,PAJ: viru+ photo+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO00/59551A1 (SAALMANN, Gerhard [DE/DE] et. al.), 12. Oct 2000, see page8 line 16-page10 line 16, page10 line 11-14, fig.1	1-9
Y	CN1249952A (Shang Hai blood center) 12. Apr 2000, see pageline27-30, page3 line7-25	1-9
A	US5304113A (The MCW Reserch Foundation, Inc., Milwaukee, Wis) , 19. Apr 1994 (19.4.1994) , see the whole document.	1-9
A	JP2000-245832A (NAGAURA Y) , 12. Sep 2000 (12.9.2000) , see the whole document.	1-9
A	US5935092A (Baxter International Inc., Deerfield, Ill.) , 10. Aug 1999 (10.8.1999) , see the whole document.	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19. Aug 2004(19.8.2004)

Date of mailing of the international search report

02 · SEP 2004 (02 · 09 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/
Xi Tu Cheng Road, Haidian District, Beijing, P.R.China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer



Yang Lisha

Telephone No. (86-10) 62085764

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2004/000516

Patent document Cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO00/59551A1	12. Oct 2000	DE19914850A	5.Oct 2000
		AU3816300A	23. Oct 2000
US5304113A	19. Apr 1994	US4775625A	4. Oct 1988
		US4915683A	10. Apr 1990
		US5039483A	13. Aug 1991
JP2000-245832A	12. Sep 2000	WO0051665A	8. Sep 2000
		JP2002058414A	26. Feb 2002
US5935092A	10. Aug 1999	CA2074830AC	21. Jun 1992
		WO9211059A	9. Jul 1992
		AU9179991A	22. Jul 1992
		EP0516839AB	9. Dec 1992
		EP19920904266	20. Dec 1991
		JP5505133T	5. Aug 1993
		JP3051998B2	12. Jun 2000
		AU648631 B	28. Apr 1994
		US5536238A	16. Jul 1996
		CA2208051A	26. Jun 1997
		WO9722245A	26. Jun 1997
		NO973790A	17. Oct 1997
		EP0809433A	3. Dec 1997
		EP19960941472	26.Nov 1996
		JP11505269T	18. May 1999
		DE69131797D	30. Dec 1999
		DE69131797T	29. Jun 2000

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000516

A. 主题的分类

IPC⁷: A61M 1/36 A61L2/08

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁷: A61M 1 A61L2

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT,WPI,EPODOC,PAJ:

病毒 光 viru+ photo+

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO00/59551A1 (SAALMANN, Gerhard [DE/DE] 等), 12.10 月 2000, 参见说明书第 6 页第 16 行-第 8 页第 16 行, 第 10 页第 11-14 行, 图 1	1-9
Y	CN1249952A (上海市血液中心) 12.4 月 2000, 参见说明书第 1 页第 27-30 行, 第 3 页第 7-25 行	1-9
A	US5304113A (The MCW Reserch Foundation, Inc., Milwaukee, Wis), 19.4 月 1994 (19.4.1994), 全文	1-9
A	JP2000-245832A (NAGAURA Y), 12.9 月 2000 (12.9.2000), 全文	1-9
A	US5935092A (Baxter International Inc., Deerfield, Ill.), 10.8 月 1999 (10.8.1999), 全文	1-9

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“&” 同族专利的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

国际检索实际完成的日期 19.8 月 2004	国际检索报告邮寄日期 02·9月 2004 (02·09·2004)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 杨莉 电话号码: (86-10)62085764

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/000516

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO00/59551A1	12.10月2000	DE19914850A	5.10月2000
		AU3816300A	23.10月2000
US5304113A	19.4月1994	US4775625A	4.10月1988
		US4915683A	10.4月1990
		US5039483A	13.8月1991
JP2000-245832A	12.9月2000	WO0051665A	8.9月2000
		JP2002058414A	26.2月2002
US5935092A	10.8月1999	CA2074830AC	21.6月1992
		WO9211059A	9.7月1992
		AU9179991A	22.7月1992
		EP0516839AB	9.12月1992
		EP19920904266	20.12月1991
		JP5505133T	5.8月1993
		JP3051998B2	12.6月2000
		AU648631B	28.4月1994
		US5536238A	16.7月1996
		CA2208051A	26.6月1997
		WO9722245A	26.6月1997
		NO973790A	17.10月1997
		EP0809433A	3.12月1997
		EP19960941472	26.11月1996
		JP11505269T	18.5月1999
		DE69131797D	30.12月1999
		DE69131797T	29.6月2000